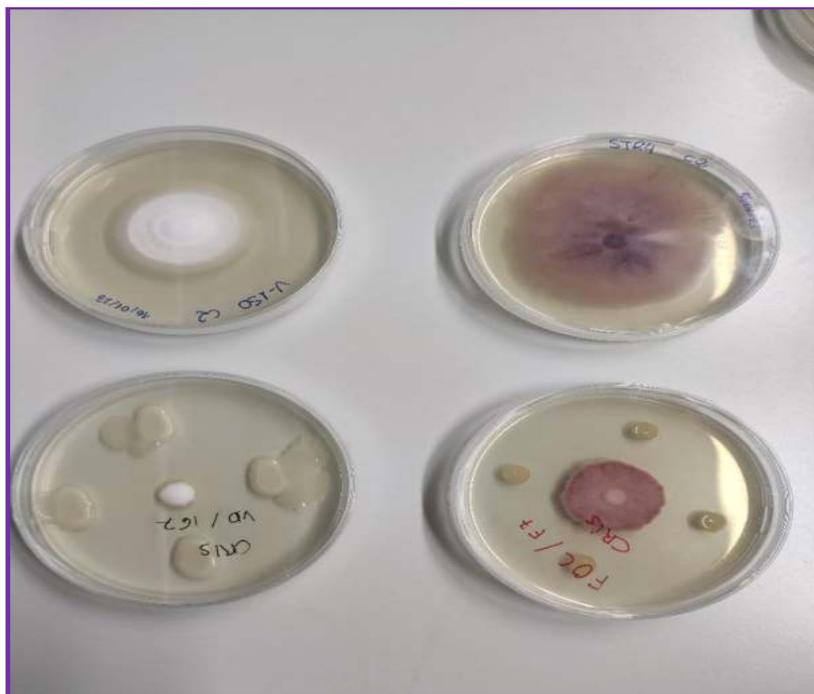


# EL ENEMIGO DE MI ENEMIGO ES MI AMIGO



**CURSO 2022-2023**

**PROFESORA IES COORDINADORA**

M<sup>a</sup> del Mar Moreda Moreno

IES Fidiana de Córdoba

**INVESTIGADORES**

Leyre Molinero Ruiz, Carmen Gómez-Lama Cabanás, Antonio Valverde Corredor, Ana Domínguez Carmona

Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC de Córdoba

**ALUMNADO**

Asier Arteaga Moya (1º BACH IES Fidiana)

Jesús López Cano (1º BACH IES Fidiana)

Cristina Luque Cumplido (1º BACH CES Lope de Vega)

Estela Muñoz Domínguez (1º BACH IES Fidiana)

Mario Padillo Toril (1º BACH CES Lope de Vega)

María Ponferrada Márquez (1º BACH CES Lope de Vega)

# ÍNDICE

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>1.- INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
<b>2.- OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>4</b>
<b>4.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>9</b>
<b>5.- RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
<b>6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>14</b>
<b>7.- AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>14</b>
<b>8.-BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>15</b>

## EL ENEMIGO DE MI ENEMIGO ES MI AMIGO

Arteaga Moya A<sup>1</sup>, López Cano.J<sup>1</sup>, Muñoz Domínguez. E<sup>1</sup>

Moreda Moreno M.<sup>1</sup>,

Luque Cumplido.C<sup>2</sup>, Padillo Toril.M<sup>2</sup>, Ponferrada Márquez.M<sup>2</sup>,

Domínguez Carmona, A<sup>3</sup>, Gómez-Lama Cabanás. C<sup>3</sup>, Molinero Ruiz, L<sup>3</sup>

Valverde Corredor A<sup>3</sup>

<sup>1</sup> IES Fidiana

<sup>2</sup> CES Lope de Vega

<sup>3</sup> Instituto de Agricultura Sostenible IAS-CSIC (Córdoba)

### ABSTRACT

The use of biological control agents (BCA), alone or in combination with other management measures, has gained attention over the past decades, driven by the need to seek for sustainable and eco-friendly alternatives to confront plant pathogens.

This use is of interest within an integrated management strategy of *Verticillium* wilt of olive (VWO) caused by the soil-borne fungus *Verticillium dahliae* Kleb and Fusarium wilt of banana () caused by soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. The root/rhizosphere of healthy olive plants is an important reservoir of microorganisms displaying biocontrol activity against VWO and FWB. Different bacterial strains have been used *in vitro* and all strains displayed growth inhibition and biocontrol effectiveness against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*.

The strain *Pseudomonas chlororaphis* (IAS-B-102) has been the most effective BCA against *Verticillium dahliae* and against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*.

VWO is a disease difficult to control and the use of BCAs can be useful within an integrated control strategy.

**Keywords:** *biocontrol, Pseudomonas, rhizobacteria, fungus, conidia, inhibition.*

### 1.INTRODUCTION

Banana(*Musa acuminata*) is one of the most important fruit and cash crop in terms of production volume and trade in the world. The global production of bananas is projected to grow at 1.5% per annum, to reach 135 million tonnes in 2028. However, a number of soil-borne pests and diseases are principal limiting factors for banana production worldwide. Among them, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* is considered one of the most destructive soil-borne fungus affecting this crop producing a destructive disease called Fusarium wilt of banana (FWB). *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* infects banana roots, progresses into the xylem of the rhizome, induces wilt, and may eventually kill susceptible cultivars.

Thus, research and crop management efforts are currently ongoing to prevent the propagation of the disease, which can seriously compromise the future of this staple food.

The manipulation and harnessing of the endophytic microbiome may help to increase crop production, reduce the incidence of diseases, improve plant resistance, and decrease agrochemicals inputs.

On the other hand, cultivated olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*) is one of the most important oil crops in the world. It constitutes an agro-ecosystem of major relevance for the Mediterranean Basin since 90% of the global olive oil and table olive production is concentrated in this area. Severe losses, and even tree death, are caused by a range of olive pathogens. Among them, the soilborne fungus *Verticillium dahliae* Kleb., causing Verticillium wilt of olive (VWO), represents a major threat in many regions where this tree is cultivated. VWO is a disease difficult to control and the use of BCAs can be useful within an integrated control strategy.

## 2.OBJETIVOS

- Comparar la eficacia *in vitro* de diferentes especies de bacterias en la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*
- Comparar la eficacia *in vitro* de diferentes especies de bacterias en la inhibición del crecimiento de *Verticillium dahliae*
- Observar diferentes grados de virulencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*.
- Obtener cultivos fúngicos monoconídicos

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.- Asignación de variables

En este proyecto de investigación se utilizaron dos tipos de variables.

- La variable independiente es el diámetro de la colonia del hongo.
- La variable dependiente discontinua es el tipo de bacteria que utilizamos

### 3.2.- Diseño del material experimental y/o de los instrumentos de recogida de información



Figura 1. Tubo eppendorf



Figura 2. Autoclave

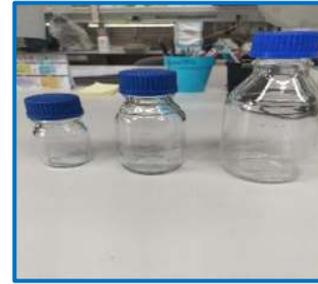


Figura 3. Frascos ISO

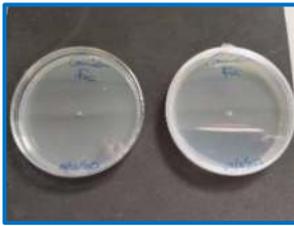


Figura 4. Placas de Petri



Figura 5. Balanza



Figura 6. Asas de siembra



Figura 7. Esteromicroscopio



Figura 8. Vortex

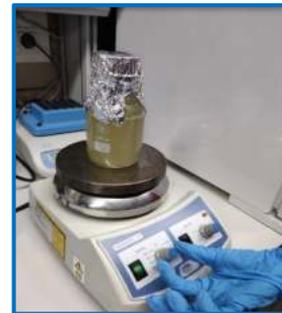


Figura 9. Agitador magnético

**1. Cámara de flujo laminar:** es utilizada para poder tener ambientes libres de contaminación.

**2. Autoclave:** es un recipiente metálico de paredes gruesas con cierre hermético que permite trabajar con vapor de agua a alta presión y alta temperatura que sirve para esterilizar instrumental. El material a esterilizar se mantiene a una presión de una atmósfera y una temperatura de 121 grados centígrados durante 20 minutos.

**3. Frascos ISO:** Se utiliza normalmente para el almacenamiento de sustancias.

**4. Placas de Petri:** destinadas para el crecimiento de bacterias u otros microorganismos.

**5. Balanza:** sirven para pesar o medir la masa de un cuerpo o sustancia. Alcanzan una gran precisión en sus medidas.

**6. Asas de siembra:** utilizados para la inoculación de microorganismos (como bacterias o levaduras), en medios de cultivo que pueden estar en placa de Petri o en tubos de ensayo.

**7. Estereomicroscopio:** es un tipo de microscopio óptico utilizado para trabajar con muestras que deben ser diseccionadas.

**8.Vortex:** utilizado para la mezcla de sustancias contenidas en tubos de ensayo o tubos de tipo eppendorf, gracias a su movimiento vibratorio. Se puede utilizar con funcionamiento en modo continuo o discontinuo presionando el soporte con el tubo.

**9 .Agitador magnético:** son equipos que permiten mezclar un líquido en un recipiente mediante un campo magnético rotatorio que hace girar a una varilla magnética.

### 3.3.-Planificación de la investigación

#### 1ª Sesión. Fecha 23/11/22

- Funcionamiento básico de un laboratorio de fitopatología
- Introducción al control biológico de enfermedades fúngicas en plantas
- Preparación de medios de cultivo.

Preparación un medio de cultivo en las placas de petri. Se utilizó PDA (Agar de patata glucosado), patata, dextrosa y agar. Agar como espesante y la dextrosa es el azúcar. Se emplea agua bidestilada. Se emplea como medio de cultivo PDA ya que favorece el crecimiento de los hongos. El medio de cultivo LBA (Agar Luria Bertani) favorece el crecimiento de bacterias.

Se pesaron los componentes por cada litro de medio de cultivo. Se prepararon 200 ml de medio de cultivo y se añadieron a frascos ISO previamente rotulados.

Seguidamente el medio de cultivo se esterilizó en el autoclave para librarla de cualquier tipo de microorganismo, se homogeneizó y se hizo el vertido del medio de cultivo estéril sobre las placas de Petri. El vertido se realizó en cámara de flujo laminar ya que el aire es estéril.

Se emplearon placas de Petri que solo llevan PDA y otras que estaban partidas; la mitad con PDA y la otra mitad con LBA.

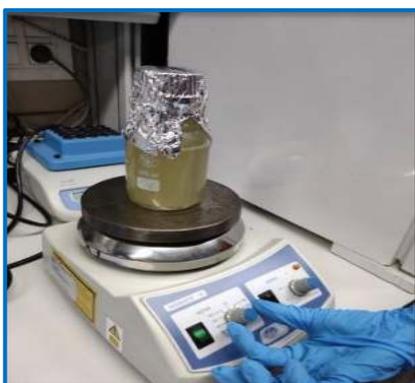


Figura 10. Preparación medio de cultivos



Figura 11. Vertido del medio de cultivo en Placas

#### ● 2ª Sesión Fecha 11/1/23

#### Observación de conidias al microscopio.

Se dispuso de dos especies de hongos en suspensión y en congelador.

Una especie es *Verticillium dahliae* Kleb y otra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Se realizó un filtrado de los cultivos fúngicos líquidos con un embudo y una gasa estériles para obtener las conidias.

Se preparó una dilución donde existieran 1000 conidias por cada 100 ml de disolución. Se observó la dilución al microscopio sobre una base con líneas horizontales y verticales para observar y contar las conidias utilizando una cámara de Neubauer o hemotocitómetro.

### Siembra de hongos

Se procedió a la siembra de los hongos en el centro de las placas de petri preparadas en la sesión anterior. Se dispone de 5 placas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* y otras cinco con *Verticillium dahliae* Kleb Además, se dispone de otra placa control. Se utilizaron cinco especies de bacterias diferentes.

En las placas control solo se añadió una gota de microlitos de los hongos a estudiar.

Para el resto de las placas se procedió de la siguiente forma:

- Se colocó una gota del hongo en el centro de cada una de las cinco placas. Se añadieron 10 microlitros de hongo.
- Se añadió en cada placa una gota con una bacteria diferente.
- La gota de la bacteria se colocó alrededor de la gota central del hongo. Se añadieron cuatro gotas de la bacteria alrededor del hongo.
- Se añadieron cuatro gotas de 10 microlitros cada una. Se trataba de ver la influencia de la bacteria sobre el crecimiento del hongo.

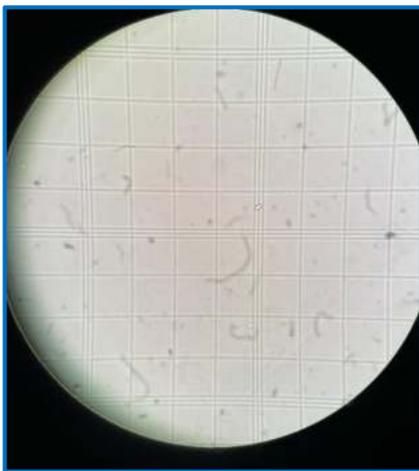


Figura 12. Recuento de conidias

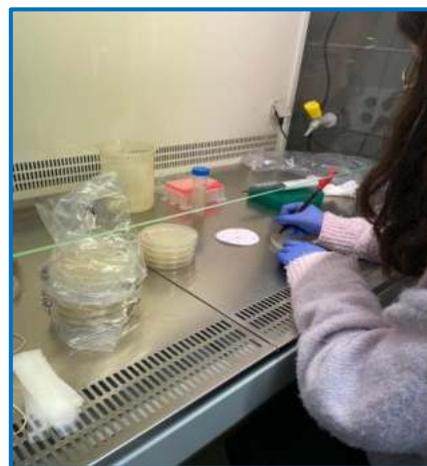


Figura.13. Siembra de hongos y bacterias

### 3ª Sesión Fecha 8/2/23

- **Evaluación del efecto de las bacterias sobre los patógenos.**
- **Cálculo del porcentaje de inhibición.**

Se dispuso de dos placas control donde solo estaban los hongos en cuestión (*Fusarium* y *Verticillum*). En dichas placas apareció una colonia circular con un determinado diámetro debida al crecimiento del hongo. Se midió el diámetro de las placas control.

Posteriormente se midió el diámetro de las placas que contienen a los hongos y las bacterias que se han añadido.

Se observó que el radio de la colonia del hongo es mucho más pequeño cuando se le añade la bacteria. Se midieron los diferentes radios y se aplicó una fórmula matemática.

La fórmula permite determinar el porcentaje de inhibición y es la siguiente:

Rc = radio colonia fúngica control

Rp =radio colonia fúngica en presencia de bacteria

$$\frac{Rc-Rp}{Rc} \times 100$$



Figura.14. Cálculo del porcentaje de inhibición

#### 4ª Sesión Fecha 8/3/23

**Obtención de cultivos monoconídicos de hongos: preparación de medios de cultivo, diluciones seriadas, conteo de conidias, siembra y aislamiento de conidias individuales.**

Se partió del micelio del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* y se prepararon dos diluciones del mismo a  $10^{-1}$  y a  $10^{-2}$ . Se hizo en cámara de flujo laminar que permitió condiciones asépticas.

De las diluciones se tomaron 100  $\mu$ l y se pasaron a placa de Petri con medio de cultivo de Agar -agua al 2%. Se introdujeron en una estufa a 25 °C durante 20-25 horas.

Posteriormente se observaron las conidias con un estereomicroscopio. Se extrajo una conidia utilizando la estereomicroscopio y una aguja (este proceso se denomina pesca de conidias). Se hizo alrededor de la conidia un recuadro y se tomó ese recuadro que se pasó a una placa de Petri con PDAy se incubó a 25°C.

El hongo obtenido se mantendrá en glicerol al 33% y se congelará a 80 grados bajo cero. De esta forma se obtiene una población homogénea del hongo necesaria para hacer ensayos de biocontrol.



Figura 15. Preparación de diluciones seriadas



Figura 16. Siembra de hongos



Figura 17. Pesca de conidias



Figura 18. Pesca de conidias

#### 5º Sesiones online mediante documentos compartidos en Google-Drive

Se trabajaron los documentos en forma plantilla en carpetas compartidas online. De esta manera todo el grupo trabajó en el desarrollo de la documentación siguiendo las indicaciones de la profesora tutora.

- a) Preparación de un resumen/abstract
- b) Preparación de una memoria de investigación
- c) Preparación de un póster/panel
- d) Preparación de una presentación en diapositivas
- e) Preparación del texto de la exposición para la defensa en el congreso
- f) Ensayos de la exposición mediante videoconferencia

### 4.FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Dentro de un agroecosistema la interacción entre un hospedante vegetal y un parásito, que se nutre del mismo provocando una enfermedad, es definida como un patosistema vegetal.

Los patosistemas investigados son:

*Olea europaea* (planta, olivo) y *Verticillium dahliae* (hongo).

*Musa acuminata* (planta, banano) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (hongo).

*Verticillium dahliae* es el agente causal de la verticilosis del olivo. Generalmente esta enfermedad se manifiesta por dos síndromes denominados apoplejía y decaimiento lento. La apoplejía consiste en la muerte rápida de ramas o del árbol completo, cuyas hojas pierden el color verde característico para tornarse marrón claro, al tiempo que se enrollan sobre el envés foliar y quedan adheridas a las ramas. Este síndrome puede tener lugar desde principios de otoño hasta finales de primavera, pero es más frecuente que se desarrolle entre el final del invierno y el principio de la primavera. El decaimiento lento se caracteriza por la defoliación parcial de ramas, cuyas hojas más jóvenes se secan sin llegar a caer. Estos síntomas se desarrollan principalmente durante la primavera, aunque también pueden ocurrir en verano, por lo que suelen ir acompañados del momificado de flores y menos frecuentemente de frutos, dependiendo del estado fenológico del árbol en el momento en el que tengan lugar los síntomas.

Destacar la importancia de nuestro país como productor del aceite de oliva. España produce el 87% de la producción mundial de aceite de oliva y Jaén produce un 70% de ese 87%.

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* es el agente causal de la Fusariosis del banano (FWB). Los síntomas son amarillamiento, seca de las hojas, desde las hojas más viejas hacia las más jóvenes. Decoloraciones de los pecíolos, que en estados avanzados provocan la caída de las hojas y su muerte. Entrenudos más cortos, reducción de la lámina foliar, malformaciones en hojas jóvenes. Las plantas enfermas producen racimos pequeños y frutos "habichuelados", sin valor comercial, por falta de llenado al carecer de una superficie foliar adecuada y una obstrucción del sistema vascular..

*Fusarium* TR4 (Raza 4 tropical) es considerada una enfermedad que produce marchitamiento y muerte de las plantaciones de banano. Habita en el suelo y puede afectar los cultivos por más de tres décadas.

El plátano es el tercer cultivo más consumido en el mundo. No solo se utiliza como alimento. La planta también se emplea en la construcción de casas, alimentar al ganado, hacer harinas...

La rizosfera es la parte del suelo próxima a las raíces, que se extiende concretamente entre 1 y 3 mm desde la superficie de las raíces al interior del suelo. La composición de la rizosfera es: suelo, agua, deposiciones radicales (exudados y mucílago) y microbiota (bacterias, hongos, algas).

En esta región edáfica interactúan las raíces de las plantas con el suelo y sus microorganismos, lo que en consecuencia reporta beneficios para las plantas.

La raíz/rizosfera de plantas de olivo sanas es un importante reservorio de microorganismos que muestran actividad de biocontrol frente a *Verticillium*

Por tanto, en la agricultura se utilizan bacterias beneficiosas ya que dificultan o anulan por completo el crecimiento de organismos que causan enfermedades en los cultivos.

Las bacterias pueden producir compuestos volátiles y enzimas líticas que afectan al crecimiento de los hongos. Por tanto, son especialmente importantes como agentes de control biológico.

Las bacterias beneficiosas utilizadas han sido:

- *Pseudomonas simiae* (PICF7)

- *Penibacillus polymyxa* (PIC73)
- *Paenibacillus terrae* (PIC167)
- *Serratia marcescens* (IAS-B-103)
- *Pseudomonas chlororaphis* (IAS-B-102)

Se han empleado dos medios de cultivo:

Medio PDA ( patata, dextrosa y agar). Agar como espesante y la dextrosa es el azúcar. Se emplea agua bidestilada. Se emplea como medio de cultivo PDA ya que favorece el crecimiento de los hongos.

El medio de cultivo LBA (Luria Bertani Agar) favorece el crecimiento de bacterias.

Existen varias fórmulas comunes del medio LBA. A pesar de que son diferentes, comparten una composición similar de los ingredientes utilizados para promover el crecimiento, incluyendo las siguientes:

- Péptidos y peptonas de caseína
- Vitaminas (vitaminas del complejo B)
- Oligoelementos (por ejemplo, nitrógeno, magnesio, azufre,)
- Minerales

## 5.RESULTADOS

### 5.1.Recogida de datos

Se tomaron medidas del radio de las colonias producidas por los hongos. En primer lugar, se midió el radio de las placas control.

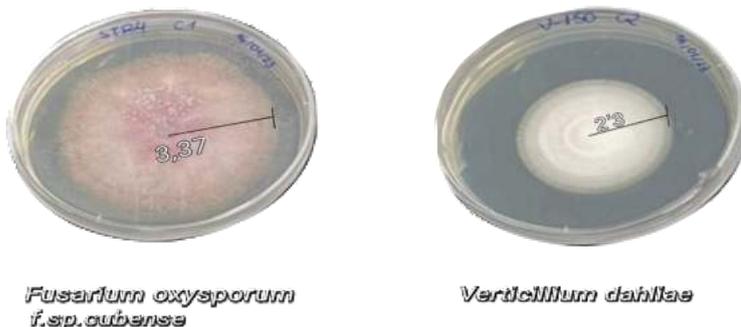


Fig.19.Medidas de los radios control

Una vez tomado su radio se comparó mediante medición con el crecimiento que estos hongos han tenido en un medio de cultivo junto a las cinco bacterias: PIC167,PIC73, PICF7,IAS-B-103 y IAS-B-102.

Para su comparación usamos la fórmula matemática:

$$\frac{Rc-Rp}{Rc} \times 100$$

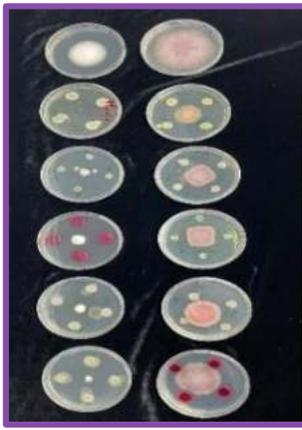


Figura 20. Placas de Petri con hongos y diferentes bacterias

En la figura 20 se observa el tamaño de la colonia del hongo dependiendo de la bacteria añadida en cada placa.

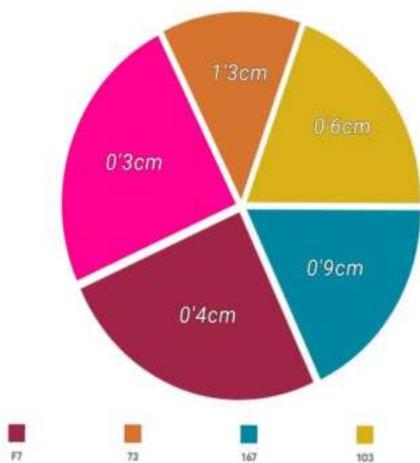
La fila superior equivale al control y a partir de ellas y hacia abajo están ordenados cada uno de los cultivos con cada bacteria y hongo; desde el cultivo más efectivo hasta el menos efectivo.

- 1- *Verticillium* a la izquierda y *Fusarium* a la derecha Control
- 2- Vd + 102 / Foc + 102
- 3- Vd + F7 / Foc + 167
- 4- Vd + 103 / Foc + 73
- 5- Vd + 167 / Foc + F7
- 6- Vd + 73 / Foc + 103

**5.2.- Resultados**

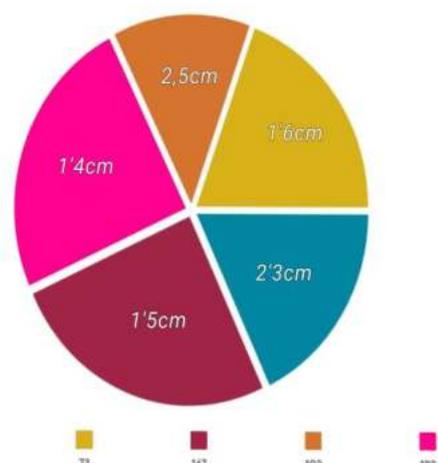
Todas las cepas mostraron inhibición del crecimiento *in vitro* de *Verticillium dahliae* y de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense siendo la cepa *Pseudomonas chlororaphis* IAS-B-102 la más eficaz.

*Verticillium*



Gráfica 1. Gráfico con el radio de *Verticillium*

*Fusarium*



Gráfica 2. Gráfico con el radio de *Fusarium*

En la gráfica 1 y 2 se aprecia cada radio del hongo que ha convivido con cada bacteria

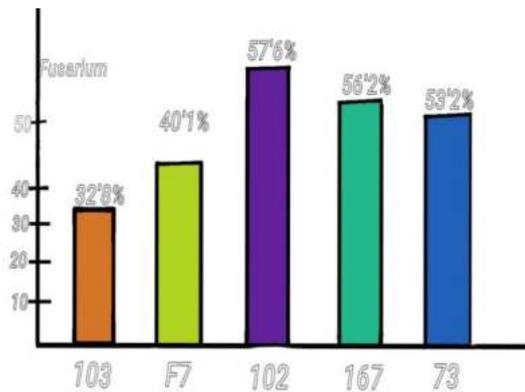


Gráfico 3. Porcentaje de eficacia frente a *Fusarium*

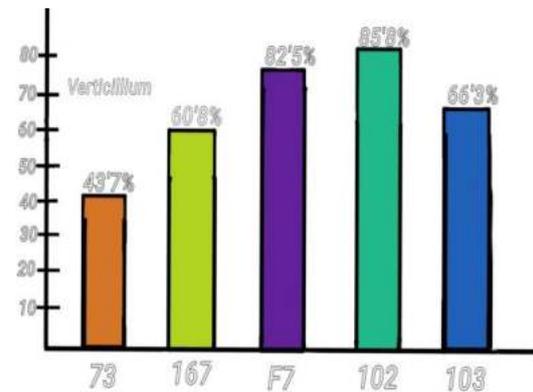


Gráfico 4. Porcentaje de eficacia frente a *Verticillium*.

En las gráficas 3 y 4 se aprecia el porcentaje de eficacia de cada bacteria inhibiendo a los hongos *Verticillium* y *Fusarium*, respectivamente.

En el eje horizontal se representan las diferentes bacterias utilizadas y en el eje vertical el porcentaje de eficacia. Cuanto mayor porcentaje menor crecimiento del hongo ha habido.

#### Placas de Petri con los cultivos monoconídicos obtenidos:



Figura 21. Hongo. Micelio de *Fusarium*



Figura 22. Colonias de conidias



Figura 23. Cultivo monoconídico



Figura 24. Imagen de una conidia

## 6.CONCLUSIONES

1) De las bacterias probadas la más eficiente frente al *Verticillium dahliae* y frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ha sido *Pseudomonas chlororaphis* IAS-B-102.

2) De las bacterias probadas, la menos eficiente en la inhibición *in vitro* del hongo *Verticillium dahliae* ha sido *Paenibacillus polymyxa* (PIC73) y la menos efectiva en la inhibición *in vitro* del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ha sido *Serratia marcescens* (IAS-B-103).

## CONCLUSIÓN FINAL

- Según estos resultados, la rizobacteria IAS-B-102 sería la candidata más prometedora para combatir la Verticilosis del olivo y la Fusariosis del banano.
- Este enfoque de control biológico de patógenos mediante el uso de rizobacterias puede contribuir de manera sustancial al desarrollo de una agricultura sostenible. Por tanto, las rizobacterias ofrecen una alternativa ecológica para controlar el ataque de patógenos y/o mejorar el rendimiento de los cultivos.

## 7.AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer...

- Al departamento de “Protección de cultivos y al laboratorio de “Interacción planta-microorganismo” por habernos facilitado los instrumentos y el lugar para realizar el proyecto. Especialmente a nuestra investigadora Carmen Gómez-Lama Cabanás, técnico Antonio Valverde Corredor y a Ana Domínguez Carmona por habernos enseñado y explicado todo lo que necesitábamos para lograr sacar adelante este proyecto.
- A la tutora del IES Fidiana M<sup>a</sup> del Mar Moreda Moreno por toda la ayuda que hemos recibido por su parte en todo momento.
- A los centros de investigación, IAS y CSIC por su colaboración
- A los proyectos Fidiciencia 2.0 y Erasmus + por un año más ayudando a los alumnos a expandir su campo de aprendizaje y a la Junta de Andalucía por la concesión del Proyecto de Innovación Educativa Fidiciencia 2.0.
- Al IES Fidiana y al CES Lope de Vega por facilitarnos el acercamiento a un proyecto de investigación.
- A nuestros padres y familias por su apoyo incondicional.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

### Articles

**Journal of Fungi.** Carmen Gómez-Lama Cabanás, Antonio J. Fernández-González, Martina Cardoni, Antonio Valverde-Corredor, Javier López-Cepero, Manuel Fernández-López and Jesús Mercado-Blanco

*J. Fungi* 2021, 7, 194.

*The Banana Root Endophytome: Differences between Mother Plants and Suckers and Evaluation of Selected Bacteria to Control Fusarium oxysporum f. sp. cubense.*

**Frontiers in Microbiology.** Carmen Gómez-Lama Cabanás, Garikoitz Legarda, David Ruano-Rosa, Paloma Pizarro-Tobías, Antonio Valverde-Corredor, José L. Niqui, Juan C. Triviño, Amalia Roca and Jesús Mercado-Blanco

*Published: 23 February 2018*

*Indigenous Pseudomonas spp. Strains from the Olive (Olea europaea L.) Rhizosphere as Effective Biocontrol Agents against Verticillium dahliae: From the Host Roots to the Bacterial Genomes.*

*This article was submitted to Plant Microbe Interactions, a section of the journal Frontiers in Microbiology*

**Agriculture.** Carmen Gómez-Lama Cabanás, David Ruano-Rosa Garikoitz Legarda, Paloma Pizarro-Tobías, Antonio Valverde-Corredor, Juan Carlos Triviño, Amalia Roca and Jesús Mercado-Blanco

*Bacillales Members from the Olive Rhizosphere Are Effective Biological Control Agents against the Defoliating Pathotype of Verticillium dahliae*

*Published: 23 June 2018*